

ESTUDO ANÁTOMO-PATOLÓGICO DA EVOLUÇÃO DA NECROSE PRODUZIDA EXPERIMENTALMENTE POR VENENO DE *BOTHIROPS JARARACA*.
INFLUÊNCIA DE SUBSTANCIA ÓRGANO-HEPARINÓIDE *

FERES SALIBA

Secção de Anatomia Patológica, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

O veneno de *Bothrops jararaca* (Wied. 1824) provoca extensas necroses no local da inoculação experimental ou acidental. Amorim, Mello & Saliba (1) descreveram experimentalmente o quadro macro e microscópico do processo em coelhos, demonstrando a existência de extensas sufusões hemorrágicas no hipoderma e musculatura adjacente, necrose de coagulação gangrenosa no ponto de inoculação, um estado de estase e pré-estase, além de capilares contendo trombos hialinos na luz. Descreveram, também, forte edema e hemorragias peri-capilares e sufusões hemorrágicas por confluência, como conseqüência do estado de peri-estase. Relataram também degeneração hialina de Zenker em feixes musculares e ainda hialino-necrose de um pré-capilar. Na parte periférica, descreveram uma larga zona de reação inflamatória exsudativa, caracterizada por intensa infiltração de granulócitos neutrófilos e de linfócitos.

Eichbaum (7), estudando a ação dermatotóxica do mesmo veneno, concluiu que, "a afinidade das dermatotoxinas para com o tecido cutâneo parece ser muito grande, visto que a injeção de doses altas de antitoxina não conseguem neutralizar o veneno injetado poucos minutos antes, no mesmo lugar".

Inúmeros trabalhos clínicos (17, 16, 14, 6, 2, 8, 3, 9, 15, 4, 10 e 11) sôbre o heparinóide de órgãos animais, afirmam sua capacidade de lesar trombos, de reabsorver hematomas e de ter marcada influência sôbre a cicatrização cutânea em vários tipos de lesões.

Degni & Langlada concluíram ter a substância heparinóide influência benéfica sôbre a cicatrização cutânea das áreas necróticas produzidas pelo oleato de mono-etanolamina injetado na orelha de coelho com o fim de determinar tromboses localizadas.

* Trabalho realizado com auxílio do Fundo de Pesquisas do Instituto Butantan (FPIB).

Recebido para publicação em maio de 1963.

Nas experiências relatadas neste trabalho, estudou-se anátomo-patologicamente a evolução da necrose produzida em coelhos pela injeção de veneno de *B. jararaca* e verificou-se se o mesmo seria influenciado pela aplicação de anticoagulante de pulmão de vitela (Hirudoid Luitpold-Werk).

MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho foram utilizados 32 coelhos machos de 2.5 kg, cujas orelhas tinham sido depiladas manualmente cinco dias antes do experimento. Na face externa da região média de uma orelha de cada animal, injetava-se subcutaneamente 1,5 mg de veneno-padrão de *B. jararaca* (dose mínima mortal para pombo: 2 μ g), dissolvidos num volume de 0,15 ml de solução de cloreto de sódio a 8,5‰. Seis horas após, cada animal recebia intravenosamente, antitoxina botrópica em dose cinco vezes superior à necessária para a neutralização do veneno administrado. Os animais foram distribuídos, 48 horas após a administração do veneno, em dois grupos de 16, recebendo cada animal do primeiro grupo uma aplicação local diária de 1,3 g de pomada, contendo em 100 g, 1 g de substância anticoagulante do tecido pulmonar de vitela, durante 7 dias. Os do segundo grupo recebiam idêntico tratamento mas não se administrava a pomada.

No final do experimento todos eles foram sacrificados e as orelhas necrosadas eram fixadas em formol neutro a 10%, incluindo-se em parafina um segmento necrosado, corando-se os cortes resultantes pela hematoxilina-eosina ou, para demonstrar pigmento hemosiderótico, pelo método de Mac Callum Hall.

RESULTADOS

Aspecto macroscópico e desenvolvimento do processo

Tanto nos animais tratados como nos não tratados com a substância heparinóide, 2 horas depois da inoculação havia intenso edema, e flexão da orelha para baixo (Fig. 3A). Concomitantemente, notava-se forte hiperemia e a formação de uma volumosa flictena que se rompia ao cabo de 24 horas. O rompimento da flictena deixava em seu lugar uma área isquêmica de necrose. Em alguns casos observavam-se hemorragias mais ou menos acentuadas, de curta duração, conseqüentes ao rompimento da flictena (Fig. 3A). Os vasos da orelha injetada apresentavam-se dilatados e repletos de sangue, e o edema agora atingia o máximo de seu desenvolvimento. Sobre a área isquêmica de necrose, formava-se uma placa de fibrina, a qual, à medida que decorriam os dias ia-se transformando numa crosta seca (Fig. 4C). A necrose, nos casos mais graves, perfura a orelha, comprometendo a cartilagem e o tecido correspondente ao lado oposto (Figs. 2B e 4B). O edema desaparecia gradualmente até que, por fim, nos casos tratados,

êle quase se limitava a uma estreita faixa bem delimitada, que circundava o ponto de inoculação, enquanto que na orelha dos coelhos não tratados, persistia numa faixa maior e mal delimitada. Às vêzes a lesão se ramificava e se desmembrava em dois ou três focos, no máximo, separados, porém próximos.

Macroscòpicamente nos casos mais graves (Figs. 2 e 4), havia, sob a crosta sêca, perda de tecido em grau acentuado com massas necróticas e às vêzes um pouco de pus. Nos menos graves a crosta caía ao cabo de 6 a 7 dias e observavam-se nítidos sinais de cicatrização (Figs. 1 e 3).

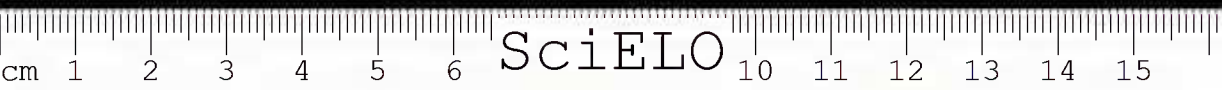
No início, as alterações desenvolviam-se nos dois grupos de animais, com os aspectos já referidos. Mais tarde, todavia, os tratados apresentavam algumas particularidades favoráveis, como se pode ver na tabela I, caracterizadas por uma evolução mais adiantada de cura em relação aos testemunhas. Na tabela, a intensidade dos processos é expressa de + a +++, sendo que + significa grau moderado, ++ grau evidente e +++ grau intenso, dependendo da extensão da lesão, medida em centímetros.

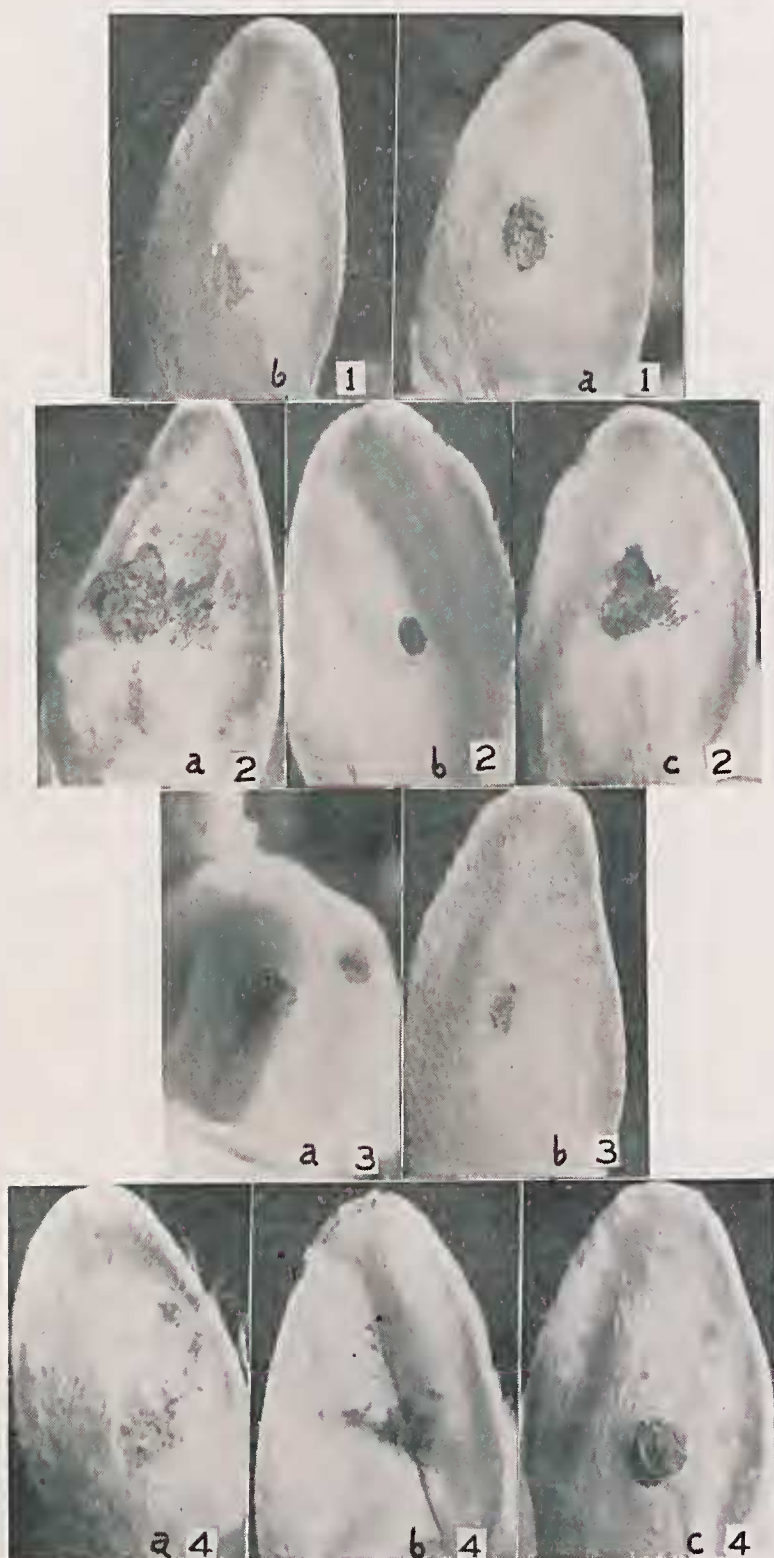
TABELA I — INFLUÊNCIA DA SUBSTANCIA ÓRGANO-HEPARINÓIDE SOBRE AS LESÕES OBSERVÁVEIS MACROSCÓPICAMENTE

		Início da experiência (2 dias)				Fim da experiência (9 dias)			
		+++	++	+	0	+++	++	+	0
A Não tratados	Necrose	13	2	1	—	8	2	5	1
	Edema	16	—		—	14	2	—	—
	Cicatrização					7	2	7	—
B Tratados	Necrose	12	2	2	—	1	5	8	2
	Edema	16	—	—	—	12	2	2	—
	Cicatrização					12	2	2	—

Coelhos com peso aproximado de 2,5 kg, injetados subcutaneamente com 1,5 mg de veneno padrão de *B. jararaca*, dissolvido em 0,15 ml de solução de cloreto de sódio a 8,5% e tratados intravenosamente com antitoxina botrópica 6 horas após. Os animais do grupo B recebiam, 48 horas depois, uma aplicação local diária de pomada contendo 1% de substância anticoagulante do tecido pulmonar de vitela, durante 7 dias.

+ grau leve, ++ grau médio, +++ grau intenso, 0 ausência.





Figs. 1 a 4 — Coelhos injetados por via subcutânea na orelha com 1,5 mg de veneno de *B. jararaca*.

Aspectos microscópicos

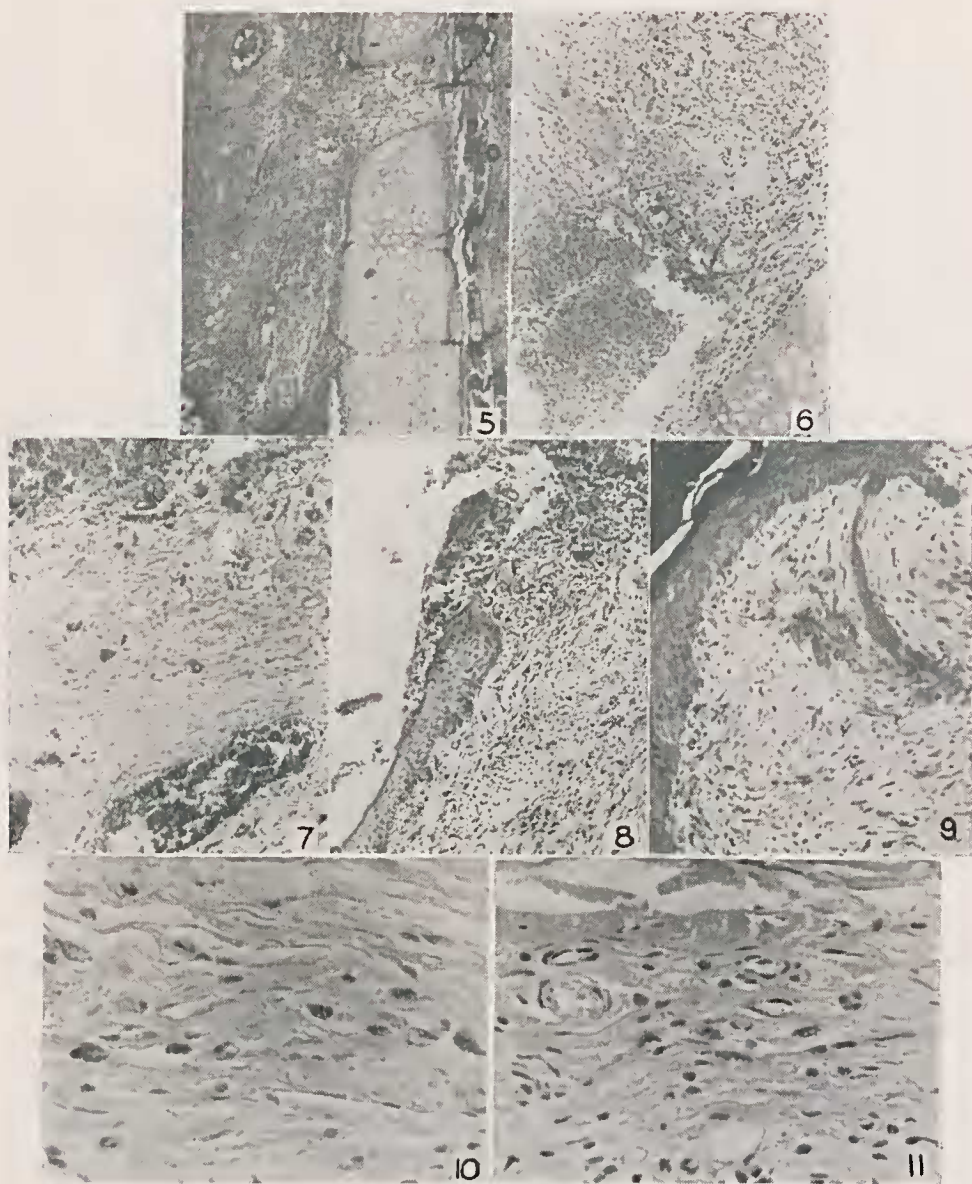
O exame microscópico, cujas lâminas foram examinadas ao acaso, com o fim de evitar erros subjetivos, revelou, nos dois grupos de animais, nos casos mais graves, o seguinte quadro: Na região da inoculação, havia uma extensa área de necrose de coagulação do tecido, que penetrava profundamente, atingindo a hipoderma, chegando a ultrapassar, em alguns casos, a própria cartilagem, que se apresentava rompida, permitindo que o processo se manifestasse também na face interna da orelha (Fig. 5). Ao redor das massas necróticas, havia regeneração do tecido adjacente, caracterizada por intensa proliferação de tecido de granulação, rico em vasos neoformados, apresentando numerosíssimos granulócitos eosinófilos (Figs. 5 e 6). Havia forte edema, hiperemia intensa e quase sempre hemorragias difusas (Fig. 7), principalmente nas partes superficiais. Nos bordos ocorria proliferação mais ou menos acentuada do epitélio de revestimento, notando-se no tecido conjuntivo subcutâneo, focos inflamatórios de natureza leucocitária esparsos e perivasais. Quando o processo se estabelecia muito próximo de arteríolas, notava-se uma intensa proliferação da adventícia. Na área necrosada, encontravam-se raras vênulas trombosadas com hialinização das paredes, parcial ou inteiramente destruídas.

Nos casos pouco graves, notava-se que a área de necrose era bem menor, melhor demarcada por tecido de granulação e não apresentava as massas necróticas centrais (Fig. 8). O tecido de granulação evidenciava intensa infiltração eosinofílica. Os vasos apresentavam-se com sangue, não havendo, porém, hiperemia acentuada. Havia edema bem circunscrito e pouco acentuado. No seio do tecido notavam-se ainda pequenos focos inflamatórios de natureza leucocitária e alguns perivasais. A reepitelização era bem evidente, chegando por véses a um "restitutio ad integrum" (Fig. 9).

Em todos os cortes corados pelo método de Mac Callum Hall, havia deposição de pigmento hemossiderótico em maior ou menor grau, demonstrando ter havido hemorragias também nas adjacências da lesão (Figs. 10 e 11).

A tabela II mostra a intensidade e a freqüência dos vários componentes das lesões microscópicas mais características no grupo tratado e no grupo testemunha, expressa nos símbolos já convenencionados de + a ++++. Nota-se particularidades favoráveis aos animais tratados, no que se refere à necrose, edema, hemorragia, hemosiderose, hiperemia, reepitelização e cicatrização, indicando que na altura dos nove dias, nos animais testemunhas, o processo estava em evolução mais atrasada do que nos animais tratados.





Figs. 5 a 11 — Cortes histológicas das orelhas dos coelhos injetados por via subcutânea com 1,5 mg de veneno de *B. jararaca*.

TABELA II — INFLUENCIA DA SUBSTANCIA ÓRGANO-HEPARINÓIDE SOBRE AS LESÕES OBSERVÁVEIS MICROSCÓPICAMENTE

	A — Não tratados				B — Tratados			
	+++	++	+	0	+++	++	+	0
Necrose	8	1	5	2	4	3	7	2
Edema	13	2	1	—	7	9	—	—
Hemorragia	11	3	—	2	1	1	5	9
Hemossiderose	3	12	1	—	2	11	3	—
Hiperemia	14	1	1	—	4	1	10	1
Reepitelização	4	2	10	—	12	4	—	—
Cicatrização	7	2	7	—	11	4	1	—

Coelhos com peso aproximado de 2,5 kg, injetados subcutaneamente com 1,5 mg de veneno padrão de *B. jararaca*, dissolvido em 0,15 ml de solução de cloreto de sódio a 8,5‰ e tratados intravenosamente com antitoxina botrópica 6 horas após. Os animais do grupo B recebiam 48 horas depois, uma aplicação local diária de pomada contendo 1% de substância anticoagulante do tecido pulmonar de vitela, durante 7 dias.

+ grau leve, ++ grau médio, +++ grau intenso, 0 ausência.

As lâminas foram examinadas ao acaso, tendo-se o cuidado de identificá-las somente no fim do exame.

COMENTÁRIOS

A análise das tabelas revelou: Necrose; não apresentava, macroscopicamente, diferenças muito significativas, eis que a ação altamente proteolítica do veneno sempre ocasiona necroses graves. Mesmo assim, nos animais tratados, a necrose mostrava-se ao final menos intensa. Havia 50% de casos graves contra 6,2%, nos casos tratados. Os casos menos graves eram de ordem de 50% nos tratados e de 31,25% nos não tratados. Havia uma certa divergência entre o resultado das observações macro e microscópicas, pois necroses mais profundas não reveladas ao primeiro exame, manifestavam-se evidentes no segundo.

Pelos dados obtidos ao exame microscópico, havia 43,75% de casos leves nos tratados e 31,25% nos não tratados; 25% de casos graves nos tratados, contra 50%, nos não tratados.

Edema — Os dados macro e microscópicos correspondiam-se aproximadamente. Havia uma porcentagem de edema da ordem de 43,75% para os tratados e de 81,25% para os testemunhas.

Hemorragia — Este é o item mais importante e mais evidente da análise. Existiam em dezesseis animais tratados, onze (68,75%) com pouquíssima ou nenhuma hemorragia, enquanto que nos não tratados existiam somente 6,2%. Estes números indicam que as hemácias extravasadas para os interstícios do tecido, eram absorvidas mais cedo, razão pela qual, quase não se notava hemácias livres nos casos tratados.

Hemosiderose — Quanto à presença de pigmento hemosiderótico nas adjacências da área afetada, notava-se um certo equilíbrio de intensidade em todos os casos examinados, quer tratados ou não. Nos grupos dos animais tratados havia 68,75% de casos moderados (++) e 75% nos não tratados. Estas cifras indicaram uma constância absoluta de hemosiderose, mostrando que nos trinta e dois coelhos, havia hemorragias e hemólise no local da inoculação.

Hiperemia — Nos animais tratados havia 62% de casos onde se manifestava hiperemia moderada, contra 6,2% dos não tratados. Em 87,5% dos casos testemunhas havia hiperemia intensa, ao passo que havia 25% nos tratados. A hiperemia, quando intensa, indicava haver um estágio de evolução mais atrasado, pois a observação demonstrava que nos casos onde a cicatrização era mais avançada, a hiperemia era menos intensa.

Recupelização — Era mais intensa nos casos tratados, que revelavam 31,25% de recupelização atrasada, em contraposição a 75% dos não tratados.

Cicatrização — Macroscopicamente havia 75% de boa cicatrização nos tratados e 43,75% nos testemunhas. A má cicatrização era da ordem de 6,2% para os tratados e 43,75% para os não tratados, havendo correspondência com a observação microscópica.

RESUMO

Foram estudadas as lesões macro e microscópicas em 32 coelhos injetados com 1,5 mg de veneno de *B. jararaca* (Wied, 1824), por via subcutânea, na face externa do pavilhão auricular direito, tratados seis horas após, com 5 ml de soro específico. O primeiro grupo de 16 coelhos foi tratado, 48 horas depois, com

substância órgão-heparinóide sob a forma de pomada dermo-absorvível, durante 7 dias. O lote testemunha não foi submetido ao tratamento da referida substância. A experiência durou 9 dias, ao cabo dos quais todos os coelhos foram sacrificados.

O estudo comparativo, realizado através do quadro macroscópico, revelou edema, hiperemia e necrose, em graus variados, tanto no lote testemunha como no lote tratado com a substância órgão-heparinóide. O quadro microscópico evidenciou necrose de coagulação do tecido afetado, acompanhado de edema, hiperemia, hemorragias difusas, focos inflamatórios esparsos e perivasais, proliferação da adventícia arteriolar, raras trombozes de vênulas com hialinização das paredes. Este aspecto era acompanhado por processos regenerativos de proliferação de tecido de granulação e por reepitelização. Em todos os cortes havia deposição de pigmento hemosiderótico nas adjacências da lesão.

Nos animais tratados, a necrose teve cicatrização mais avançada, o edema foi menos intenso, a reepitelização mais acentuada, a hiperemia menos intensa e as hemorragias menos freqüentes. Em todos os casos observou-se pigmento hemosiderótico nos cortes, denotando hemorragias na evolução do processo.

SUMMARY

Macro and microscopic lesions were studied in 32 rabbits injected with 1.5 mg of venom of *Bothrops jararaca* (Wied, 1824), subcutaneously, on the external side of the right auricular pavillion, treated after six hours with 5 ml of specific serum. The first group of 16 rabbits was treated 48 hours afterwards with organo-heparinoid substance as a dermo-absorbable ointment for 7 days. The witness lot was not treated with the above mentioned substance. The experiments lasted 9 days, after which, all rabbits were sacrificed.

The comparative study, performed by means of the macroscopic picture revealed oedema, hyperemia and necrosis in different degrees, in the witness lot as well as in the lot treated with the heparinoid substance. The microscopic picture showed coagulation necrosis of the affected tissue, followed by oedema, hyperemia, diffused hemorrhages, dispersed and peri-vasal inflammatory focuses, proliferation of the arteriolar adventitia, seldom thrombosis of the venulae with hyalinization of the walls. The aspect was followed by regenerative processes of proliferation of granulation tissue and reepithelization. In all the sections, we verified the deposition of hemosiderotic pigments in the surroundings of the lesion.

In the animals treated, the necrosis that always existed in all cases had a more advanced cicatrization, the oedema was less intensive, the reepithelization more accented, the hyperemia less intensive and the hemorrhages not so frequent. In all cases, hemosiderotic pigment could be observed in the sections, showing hemorrhages in the evolution of the process.



BIBLIOGRAFIA

1. Amorim, M. F.; Mello, R. F. & Saliba, F. — Envenenamento botrópico e cro-tálico. Contribuição para o estudo experimental comparado das lesões. *Mem. Inst. Butantan*, 23:63-108, 1951.
2. Beller, F. K. — Experimentelle und klinische Untersuchungen des Hirudoid. *Aerztl. Forsch.*, 5:127-131, 1951.
3. Brunner, O. — Der Heparintoleranztest nach Hirudoid Anwendung. *Gynacco-logia*, 1:13, 1954.
4. Daniel, W. & Somloi, L. — Fuenf Jahre Thromboembolie Prophylaxe mit Hi-rudoid. *Wien. Med. Wschr.*, 24:512-513, 1958.
5. Degni, M. & Langlada, F. G. — Ação fibrinolítica de substância heparinóide (L 942) sôbre trombos venosos produzidos experimentalmente. *Rev. Ass. Med. Bras.*, 7:287-290, 1961.
6. Dieckmann, G. — Hirudoid zur Behandlung thrombotischer Prozesse in der Schwangerschaft und im Wochenbett. *Med. Klin.*, 29:798-799, 1951.
7. Eichbaum, F. W. — Ação dermatotóxica de venenos ofídicos e sua neutrali-zação pelos anti-venenosos. *Mem. Inst. Butantan*, 20:79-94, 1947.
8. Heimedinger, J. — Zur Ambulanten Behandlung thrombotischer und lokaler Entzündungsprozesse sowie von Haematomen und Kontusionen mit Hiru-doid-Salbe. *Praxis*, 42:890-892, 1953.
9. Holzknrecht, F. — Klinische und experimentelle Erfahrungen mit der Hirudoid-Salbe. *Schweiz. Med. Wschr.*, 8:254-256, 1954.
10. Methner, U. — Erfahrungen mit der Hirudoid-Salbe. *Der Prakt. Tierarzt*, 7:1958.
11. Roesner, J. — Klinische Erfahrungen mit Hirudoid-Salbe. *Die Medizinische*, 7:299-301, 1959.
12. Rosenfeld, G. & Sawaya, P. — Comunicação pessoal.
13. Schimert, G. & Struppler, A. — Ueber perkutane Beeinflussung der Blutgerin-nung. *Muench. Med. Wschr.*, 93:278-283, 1951.
14. Schmidt, G. — Ueber die Beeinflussung von Haematomen durch Hirudoid. *Muench. Med. Wschr.*, 101:2021-2023, 1959.
15. Schuster, A. — Kontrolle des Behandlungseffektes bei Ulcus cruris und Throm-bophlebitis mittels Infrarot-Photographie. *Med. Klin.*, 23:982-983, 1956.
16. Spohn, K. & Peschel, G. — Kritische Betrachtungen zur perkutanen Beeinfluss-barkeit der Blutgerinnung durch Hirudoid. *Der Chirurg*, 11:481-483, 1951.
17. Wenning, R. — Erfahrungen mit Hirudoid. *Muench. Med. Wschr.*, 92:294-295, 1950.

